

13.7.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2003年 7月16日

出願番号
Application Number:

特願2003-197937

[ST. 10/C]:

[JP2003-197937]

出願人
Applicant(s):

東洋紡績株式会社
日立マクセル株式会社

REC'D 26 AUG 2004

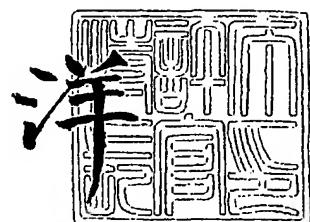
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 A5995
【提出日】 平成15年 7月16日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12M 1/42
C12N 15/10

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 楠本 正博

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 東洋紡績株式
会社 バイオケミカル事業部内

【氏名】 西矢 芳昭

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市丑寅一丁目1番88号 日立マクセル株式
会社内

【氏名】 岸本 幹雄

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市丑寅一丁目1番88号 日立マクセル株式
会社内

【氏名】 梅林 信弘

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000005810

【氏名又は名称】 日立マクセル株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712305

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体成分分離用デバイス、およびそれを用いた生体成分の分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともいずれかの表面に1または複数本の溝が形成されてなる一対の基板を上記溝が内側となるように貼り合わせてなるチップと、磁気応答粒子とを備える生体成分分離用デバイス。

【請求項2】 上記溝が、チップ内において少なくとも1個の区画室および該区画室に連通する流路を形成してなることを特徴とする、請求項1に記載のデバイス。

【請求項3】 上記溝が、区画室内に突出する突起を有することを特徴とする請求項2に記載のデバイス。

【請求項4】 生体成分が核酸である、請求項1～3のいずれかに記載のデバイス。

【請求項5】 磁気応答粒子が、シリカをさらに含有することを特徴とする請求項4に記載のデバイス。

【請求項6】 請求項1～3のいずれかに記載のデバイスを使用して生体成分を分離する方法であって、以下の(a)～(d)の工程を有することを特徴とする生体成分の分離方法。

(a) 基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように生体成分分離用デバイスを保持する工程、

(b) 磁気応答粒子と、生体成分を含有する液体試料とを接触状態に保持する工程、

(c) 磁気応答粒子を液体試料から分離する処理を行う工程、

(d) 生体成分を磁気応答粒子から分離する処理を行う工程。

【請求項7】 磁気応答粒子が強磁性粒子を含有することを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】 工程(c)が、磁場をかけて磁気応答粒子を動かすものである、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】 工程(d)が、生体成分を溶媒中に溶出させるものである、請求項6～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 工程(d)が、電場をかけて生体成分を磁気応答粒子から分離させる工程を含むものである、請求項6～8のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 上記各工程の少なくとも一つを自動的に制御することを特徴とする、請求項6～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 生体成分が核酸である、請求項6～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 磁気応答粒子がさらにシリカを含有するものである、請求項12に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、目的とする生体成分を含有する液体試料中の生体成分を分離するためのデバイス、およびそれを用いた生体成分の分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

核酸やタンパク質などの生体成分を含有する細胞等の生物材料からの生体成分の分離（抽出・精製）は、遺伝子工学・タンパク質工学や臨床診断の分野では重要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析しようとする場合、まず、その遺伝子を保持する細胞などの生物材料からDNAやRNAといった核酸を抽出することが必要である。また、あるタンパク質について解析しようとする場合についても、まず、そのタンパク質を保持する細胞等の生物材料からの分離・精製を行うことが必要である。さらに、細菌やウイルスといった感染体の検出のためのDNA／RNA診断においても、血液などの生物材料から細菌やウイルスの核酸を抽出した後、検出することが必要である。

【0003】

一般に、生物材料に含まれる核酸やタンパク質などの生体成分は、遊離した状態で存在するわけではなく、タンパク質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁

の殻の中に存在している。したがって、生物材料から生体成分を分離する場合には、まず超音波や熱による物理的破碎処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理などを施すことにより生体成分を遊離させ、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破碎物中から生体成分を精製する必要がある。これらの手法は、生体成分の種類や出発材料、さらには分離した生体物質の用途に応じて組み合わされ、それぞれ最適化されて用いられている（例えば、非特許文献1を参照）。

【0004】

しかし、これらの方法は遠心分離などの煩雑な工程を含むため非常に手間がかかる作業である。さらに、これらの方法により分離された核酸やタンパク質などの生体成分サンプル中には、その後の解析にとって弊害となる非目的タンパク質などの夾雑物質が多く含まれている。そのため、純度よく生体成分を得るために、これらの分離（抽出・精製）操作を行った後に塩化セシウムによる密度勾配を利用した超遠心分離操作、透析や限外濾過を利用した脱塩濃縮操作に代表されるような煩雑で、かつ長時間を要する精製操作を行う必要がある。

【0005】

ところで、核酸については、簡便な抽出法としてシリカを核酸結合性固相担体として使用する方法が知られている（例えば、特許文献1を参照）。この方法は、バクテリアなどの生物材料から核酸を一段階で抽出することが可能な上、溶出液として水またはTEバッファーなどの低濃度の緩衝液を使用するため、特別な脱塩濃縮操作が不要で、抽出した核酸を直ちに後の解析に使用することができるという利点がある。

しかしながら、本方法によりシリカから溶出させて得られた核酸は濃度が低く、収量においても満足できるものではなかった。したがって、少量の核酸で分析が可能なPCR（Polymerase Chain Reaction）などには通常のスケールで適用できるが、サザンハイブリダイゼーションやノーザン・プロットなどの分析には大スケール化とその後の濃縮工程という煩雑な操作を必要とする。また、この方法では、核酸の抽出・精製に十分な量の核酸結合性固相担体が必要であり、スケールを微小化し得た装置の実現が困難であった。さらに、このような従来の方法

によるシステムを自動で行い得るシステムを構築するためには、核酸が結合した担体の攪拌、分離、移動の諸動作のためにピペット操作を行うロボットアームを有する大掛かりな装置を必要とするため、システムの微小化はさらに困難であった。

【0006】

更に簡便性を高めた核酸抽出方法として核酸結合用磁性担体を使用する核酸単離方法があり、例えば核酸が共有結合し得る重合性シラン被膜により覆われた超常磁性酸化鉄核を有する磁気応答粒子を利用することが知られている（例えば、特許文献2を参照）。しかしながら本方法も、溶出させて得られた核酸の濃度、収量における不満を解消できるものではなかった。またこの方法では、スケールの微小化への適用が困難であるという問題もあった。

【0007】

また、生物材料からの生体成分の分離（抽出・精製）を微小スケールで行い得ることは、サンプルに含まれる微量の核酸やタンパク質の分析を可能とし、診断分野への用途開拓が期待される。しかしながら現在に至るまで、限られた面積の平面領域内で生体成分の分離（抽出・精製）工程を実行し得るデバイスは開発されていない。

【0008】

【特許文献1】

特開平2-289596号公報

【特許文献2】

特開昭60-1564号公報

【非特許文献1】

Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、核酸やタンパク質などの生体成分を含有する液体試料からの生体成分

の分離（抽出・精製）に関する一連の操作を微小化スケールで実現可能なデバイスおよびそれを利用した方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、まず、強磁性酸化鉄粒子をシリカで被覆してなる磁気応答性粒子を用いることで、適宜、磁場・電場をかければ簡便かつ安価に攪拌、分離、移動の諸動作を行うことができ、非常に効率良く核酸を抽出することができることを見出した。また、1または複数本の溝が形成された一対の基板を溝が内側となるように貼り合わせたチップを用い、これを基板の貼り合わせ面が水平面に対し略垂直となるように保持し、基板内に形成された空間内で上記磁気応答性粒子を用いた核酸抽出を行うことにより、核酸抽出の効率が著しく向上することを見出した。さらに、核酸がリン酸結合骨格を有するため負の電荷を持つことを利用し、磁気応答性粒子を含む系を電場に置くことで、磁気応答性粒子から核酸を高収率で遊離することも見出した。これらの知見に基づけば、従来の方法では小型化が困難であった核酸の抽出・精製工程を小型化し得、安価かつ簡単な構成にて分析に適した核酸を得ることができ、また、使用する液体試料の量が極めてわずかであっても高感度な分析が可能となる。したがって、システムの微小化が容易であり、微小化可能な核酸分析のトータルシステム、いわゆる核酸分析の微小化TAS（トータル・アナリシス・システム）を実現することが可能になる。

【0011】

すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

- (1) 少なくともいずれかの表面に1または複数本の溝が形成されてなる一対の基板を上記溝が内側となるように貼り合わせてなるチップと、磁気応答性粒子とを備える生体成分分離用デバイス。
- (2) 上記溝が、チップ内において少なくとも1個の区画室および該区画室に連通する流路を形成してなることを特徴とする、上記(1)に記載のデバイス。
- (3) 上記溝が、区画室内に突出する突起を有することを特徴とする上記(2)に記載のデバイス。
- (4) 生体成分が核酸である、上記(1)～(3)のいずれかに記載のデバイ

ス。

(5) 磁気応答粒子が、シリカをさらに含有することを特徴とする上記(4)に記載のデバイス。

(6) 上記(1)～(3)のいずれかに記載のデバイスを使用して生体成分を分離する方法であって、以下の(a)～(d)の工程を有することを特徴とする生体成分の分離方法。

(a) 基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように生体成分分離用デバイスを保持する工程、

(b) 磁気応答粒子と、生体成分を含有する液体試料とを接触状態に保持する工程、

(c) 磁気応答粒子を液体試料から分離する処理を行う工程、

(d) 生体成分を磁気応答粒子から分離する処理を行う工程。

(7) 磁気応答粒子が強磁性粒子を含有することを特徴とする上記(6)に記載の方法。

(8) 工程(c)が、磁場をかけて磁気応答粒子を動かすものである、請求項6または7に記載の方法。

(9) 工程(d)が、生体成分を溶媒中に溶出させるものである、上記(6)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 工程(d)が、電場をかけて生体成分を磁気応答粒子から分離させる工程を含むものである、上記(6)～(8)のいずれかに記載の方法。

(11) 上記各工程の少なくとも一つを自動的に制御することを特徴とする、上記(6)～(10)のいずれかに記載の方法。

(12) 生体成分が核酸である、上記(6)～(11)のいずれかに記載の方法。

(13) 磁気応答粒子がさらにシリカを含有するものである、上記(12)に記載の方法。

【0012】

【発明の実施の形態】

図1は、本発明の生体成分分離用デバイス1の好ましい一例を模式的に示す図

である。本発明の生体成分分離用デバイス1は、磁気応答粒子を利用して、生体成分を含有する液体試料から生体成分を分離（抽出・精製）するためのデバイスであり、少なくともいずれかの表面に1または複数本の溝4が形成された一対の基板3を上記溝が内側となるように（溝が形成された基板表面が露出しないように）貼り合わせてなるチップ2と、磁気応答粒子（図示せず）とを備える。

なお本明細書中における「生体成分を含有する液体試料」としては、DNA、RNAまたはタンパク質を含む、例えば、血液、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母、動物組織、植物組織、バクテリオファージ、ウイルス、細菌あるいはこれらの組み合わせが例示される。

【0013】

本発明に使用される基板3は、板状物であれば、その主面形状に特に制限はなく、方形状（正方形、長方形）、円形状（真円形状、橢円形状）、三角形状、多角形状などであってよいが、取扱い性、強度、成形または加工の容易性の観点から、その主面形状が方形状の板状物であるのが好ましい。基板3の大きさにも特に制限されないが、システムの微小化の観点からは、その内部で後述するような生体成分の分離を行い得るならば、その主面の面積が可及的に小さいことが好ましく、具体的には、 $1\text{ cm}^2\sim 100\text{ cm}^2$ （特に、 $5\text{ cm}^2\sim 40\text{ cm}^2$ ）が好適である。なお本発明におけるチップ2は、上述のように溝が内側となるように一対の基板3を貼り合わせて形成されるが、貼り合わせた状態で溝が形成された基板表面が露出しないならば、各基板は互いに同じ大きさでも異なる大きさでもよい。また、基板3の厚みも特に制限されるものではないが、後述するようにチップの外部より与える磁場の大きさが磁石からの距離に依存するために、 $0.5\text{ mm}\sim 5\text{ mm}$ であるのが好ましく、 $1\text{ mm}\sim 2\text{ mm}$ であるのが好ましい。各基板3は、互いに同じ厚みであっても、互いに異なる厚みであってもよい。

【0014】

基板3は、必要に応じ、たとえば、濡れ性の向上、表面張力の調整、試薬による基板の溶解、腐食などの化学反応防止などの目的で、表面加工が施されていてもよい。表面加工の方法は、後述する基板の形成材料や目的に応じ従来公知の表面加工処理を適宜適用すればよく、特に制限されるものではない。たとえば、濡

れ性を向上する表面処理を施す場合には、使用する試薬と親和性のある官能基を有する物質を用いた基板コーティング、蒸着、スパッタなどの方法により表面処理を行えばよい。

【0015】

基板3を形成する材料としては、特に制限されるものではなく、例えば、ポリカーボネート、アクリル、ポリオレフィンなどの熱可塑性樹脂、ポリイミドなどの熱硬化性樹脂や石英ガラス、耐熱ガラスなどのガラスやシリコン、G a A sなどの半導体、A l N、A l₂O₃などのセラミック、C u A l、S U Sなどの金属、ナイロン、ポリエチレン、ポリエステルなどで形成された繊維、カーボン、グラファイト、ダイヤモンドライクカーボン、フラーレン、カーボンナノチューブなどの炭素誘導体、木材などが挙げられる。後述するようにチップの外部より磁場（および場合によっては電場）を与えることによって生体成分の分離を行わしめる観点、加工の容易さ（場合によってはさらに表面処理のし易さ）の観点、また、カオトロピック物質など試薬に対する耐性（耐薬品性）の観点、P C Rまでも区画室内で行わしめる場合には温度耐性の観点、あるいは外部よりの視認性の観点などから、少なくとも一方の基板が樹脂、ガラス、セラミック、非磁性金属などの強磁性を有しない材料にて形成されるのが好ましく、特にまた電場を与える場合には局部的に電場を集中させやすい樹脂、ガラス、セラミックにて形成されてなるのが好ましい。なお、各基板3は、互いに同じ材料にて形成されても、互いに異なる材料にて形成されていても勿論よい。

【0016】

本発明においてチップを形成する一対の基板のうち少なくとも一方の基板に1または複数本形成される溝4は、該溝が内側となるように基板3を貼り合わせた状態で、チップ2の内部にて磁気応答粒子を使用した生体成分の分離を行わしめることが可能な空間が形成されるならば、その形状、大きさ、本数に特に制限はない。溝は、たとえば基板の形成材料が樹脂である場合には射出成形により、またたとえば基板の形成材料がガラス、石英などの場合にはエッチングや研削などにより、基板の形成材料に応じ、従来公知の適宜の手段を用いて基板主面に形成することができる。

【0017】

生体成分の分離を効率的に行わしめる観点からは、溝は、少なくとも1個の区画室5および該区画室5に連通する流路6を形成してなるのが好ましい。

区画室5は、磁気応答粒子を用いて生体成分を含有する液体試料から生体成分を分離せしめるための空間領域であり、その大きさに特に制限はなく、区画室5を複数個有する場合、各区画室5は全て同一の大きさであっても互いに異なる大きさであってもよい。スケールを微小化し得る観点からは、区画室5は1mm³～400mm³の容積を有しているのが好ましく、30mm³～100mm³の容積を有しているのがより好ましい。また区画室5の形状にも特に制限はなく、方形状（直方形状、立方形状）、円柱状、球状、円錐状などの適宜の形状の空間領域で実現することができるが、溶液の保持性、取扱い性、成形または加工の容易性の観点からは、直方形状が好ましい。

【0018】

流路6は、各区画室5を連通するように形成されているならば、特に制限されるものではない。後述するように、本発明のデバイス1を用いて液体試料中の生体成分を分離する場合、その基板3の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように保持されて使用されることが好適である観点からは、流路6は、このように保持した際に区画室5が水平方向に対し略垂直な方向にできるだけ長手となるよう、区画室の一方側の端部において各区画室5を互いに連通するように形成されるのが好ましい（上記基板3の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように保持する際には、この流路6にて連通された区画室5の端部を上側とする。）。上記流路の幅は、生体成分分離用デバイスのスケールの微小化の観点から、5μm～5mmであるのが好ましく、50μm～3mmであるのがより好ましい。流路6は、全てが同一の幅であってもよく、また全てが互いに異なる幅であってもよい。流路6の形状についても、後述する磁気応答粒子—生体成分結合体が移動し得るならば特に制限はなく、直線状であっても曲線状であってもよいが、図1に示す流路6のように直線状であるのが好ましい。

【0019】

溝4の深さは、特に制限されるものではなく、基板3の厚みも勘案し適宜選択

することができるが、デバイス全体の微小化の観点（区画室に収容させる試薬等の必要量は対象とする液体試料に応じ概ね決まっており、溝の深さが小さい程基板主面の面積を大きくせねばならない）からは、0.1 mm～4.5 mmであるのが好ましく、0.5 mm～1.5 mmであるのがより好ましい。溝4の深さは、区画室5と流路6とで互いに異なるように形成されていてもよい。

【0020】

また、本発明における区画室5は、上述したような空間領域が形成されているならば、その壁部が適宜の凹凸部分や湾曲、屈曲した部分を有していてもよい。生体成分と磁気応答粒子とを効率的に攪拌し得る観点からは、溝4は、区画室5内に突出する突起7を有することが好ましい。突起7は、上述したようにデバイス1が基板3の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように保持されて使用されることが好適であることを鑑みると、上記流路6で連通されているのとは反対側の端部（上記保持した際に下側とする端部）に形成されるのが好ましい。

【0021】

図1には、例えば、長方形形状の主面形状を有するチップ2を有し、第一幅方向Xに沿って並ぶように設けられた約4 mm（第一幅）×約15 mm（第二幅）×約1 mm（深さ）の直方形形状の区画室5を複数個（具体的には、6個）有し、それぞれの区画室5が、幅1.5 mm、深さ0.8 mmの流路6にて互いに連通されてなる例を示している。流路6は、各区画室5の第二幅方向Y一方側においてそれぞれ互いに隣り合う区画室を連通してなる。また図1に示す例の生体成分分離用デバイス1は、各区画室5の第二幅方向Y他方側において磁気応答粒子を効率的に攪拌するための突起7を有する。

ここで、上記第一幅方向Xとは、チップの長方形形状の主面を形成する4辺において互いに垂直な2辺のうち長辺に概ね沿った方向をさし、上記第二幅方向Yとは、上記2辺のうち短辺に概ね沿った方向をさす。なお第一幅方向X、第二幅方向Yおよび厚み方向Zは、互いに垂直に交わる三軸に沿った方向である。

【0022】

また、本発明のデバイス1における溝4は、生体成分を含有する液体試料（および場合によっては磁気応答粒子）をチップ2内に注入するための注入口8、な

らびに、液体試料より分離した生体成分をチップより取り出すための排出口9においてチップ2の外部空間と連通してなるのが好ましい。さらに後述するように、各区画室5は、流路にて生体成分の分離に要する試薬を区画室に注入するための試薬注入口10に連通するように形成されていてもよい（図1を参照）。

【0023】

基板3を貼り合わせる手段としては、上記基板3に形成された溝が内側となるように基板を貼り合わせ可能なものであれば特に制限されるものではなく、例えば、2液型または1液型の熱硬化性樹脂、紫外線硬化性樹脂などで形成された公知の接着剤や、粘着テープなどの粘着剤、Au-Sn、Snなどの低融点金属、超音波融着などが挙げられる。中でも比較的広範囲の材料を容易に接着できる、気密性が高い、安価であるなどの理由から、接着剤によって基板3を貼り合わせるのが好ましい。

【0024】

なお、本発明のデバイスを用いて生体成分を分離する対象は液体試料であり、また後述するように区画室に試薬を収容することから、チップの貼り合わせ面の外周は、密封されてなるのが好ましい。密封に使用される材料としては特に制限はなく、たとえば、シリコーンゴム、アクリルゴム、ウレタンゴムなどのゴム材やフッ素樹脂、石綿、金属、セメントなどが挙げられるが、液漏れや逆流を防止しつつ注射針などを用いて外部よりチップ内の溝に試薬を注入でき、また、加工が容易であるなどの利点もあることから、ゴム材にて上記貼り合わせ面の外周を密封してなるのが好ましい。

【0025】

本発明のデバイスは、区画室に予め試薬を収容した商品形態にて供されてもよい。この場合、上記のように基板の貼り合わせ面の密封を施す場合、密封後に試薬を区画室に注入するようにしてもよいし、試薬を区画室に注入した後に貼り合わせ面を密封するようにしてもよい。試薬の注入には、後述する試薬カートリッジ15を好適に使用することができる。

【0026】

本発明の生体成分分離用デバイスは、チップに加えて、磁気応答粒子を有する

。磁気応答粒子は、チップ内に予め収容されていてもよいし、液体試料をチップ内に注入する際に、チップ内に注入するようにしてもよい。本発明に使用される磁気応答粒子は、強磁性粒子を含有しているものであれば、当分野において従来公知のものを特に制限なく使用することができる。ここで「強磁性粒子」とは、磁気応答性（磁界に対する感応性）を有する粒子を指し、磁気応答粒子とした場合に磁気応答性を付与し得るものであれば、超常磁性を示す粒子も含む。ここで「磁気応答性を有する」とは、外部磁界が存在するとき、磁界により磁化する、あるいは磁石に吸着するなど、磁界に対して感応性を示すことを指す。

【0027】

強磁性粒子としては、上記磁気応答性を示す従来公知のものであれば特に制限はなく、鉄、コバルト、ニッケルなどの金属粒子や酸化鉄、二酸化クロムなどの酸化物やこれらの酸化物の複合体、さらには各種の金属間化合物などから選ばれる少なくともいずれかが使用可能である。中でも、酸化鉄を主体にした金属製の粒子を酸化反応させて得られた粒状物（強磁性酸化鉄粒子）は、各種薬品中に分散させて使用するときの品質面での安定性が優れ、かつ磁界に対する感応性に優れているため好ましい。強磁性酸化鉄粒子としては、従来公知の種々の強磁性酸化鉄粒子を使用することができるが、中でも化学的安定性に優れることからマグネタイト (Fe_3O_4) 粒子、マグヘマイト ($\gamma-Fe_2O_3$) 粒子、マグネタイト-マグヘマイト中間体粒子、マンガン亜鉛フェライト ($Mn_{1-X}Zn_XFe_2O_4$) 粒子などのフェライト粒子から選ばれる少なくとも一種であるのが好ましく、中でも大きな磁化量を有しているため磁界に対する感応性に優れるマグネタイト粒子であるのが特に好ましい。強磁性酸化鉄粒子は、例えば水中で $Fe(OH)_2$ などの粒子を酸化反応させる従来公知の方法にて作製することができる。

【0028】

本発明の生体成分分離用デバイスを用いて核酸を抽出する場合は、磁気応答粒子として、上述した強磁性粒子とシリカとを含有するものを使用するのが好ましい。ここでシリカは、強磁性粒子の外側を覆って、磁気応答粒子の最外層にシリカの層を形成しているのが好ましい。この場合、シリカの層は、強磁性粒子を完全に覆うように形成されていてもよく、また、核酸とシリカとの結合性を阻害し

ない範囲であれば強磁性粒子の一部が露出してなるように形成されていてもよい。強磁性粒子1個がシリカにて被覆されて1個の磁気応答粒子が形成されても、強磁性粒子が2個～100個集結した塊状物がシリカにて被覆されることで1個の磁気応答粒子が形成されてもよい。なお磁気応答粒子のシリカは、 SiO_2 結晶および他の形態の酸化ケイ素分子、 SiO_2 から構成されるケイソウ植物の骨格ならびに無定型酸化ケイ素を含む。

【0029】

図2は、本発明の生体成分分離用デバイス1と組合わせて、液体試料からの生体成分の分離に好適に使用できる、チップトレイ13、試薬カートリッジ15、マグネット駆動装置16を模式的に示す図である。また、図3は、本発明の生体成分分離用デバイス1を用いた生体成分の分離方法を模式的に示す図である。

チップトレイ13は、後述する本発明の生体成分の分離方法の工程(a)において、デバイス1を基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように保持するために好適に使用できる手段である。チップトレイ13は、たとえば、図2に示すようなデバイス1を挿入可能な凹部14を上面に有し、この凹部14にデバイス1を挿入することによって(図3(a))、デバイス1をその基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように支持できるような構造を備えるように実現される。

試薬カートリッジ15は、後述する本発明の生体成分の分離方法の工程(b)や工程(d)において、区画室5に、生体成分の分離に要する各種試薬16を供給するためのカートリッジである。試薬カートリッジ15は、たとえば、カートリッジ本体17より突出するように形成された試薬供給口18を有し、この試薬供給口18を上述したデバイス1の試薬注入口10に挿入して(図3(a))、区画室に試薬16を供給し得るよう実現される。

マグネット駆動装置19は、後述する本発明の生体成分の分離方法の工程(c)において、磁場を発生させるための手段である。かかるマグネット駆動装置19にて発生させた磁気によって、磁気応答粒子を感應させて移動させることができる。

その他、場合によっては、電場を与えるためのパワーサプライやピペッティン

グ手段、制御手段なども、本発明の生体成分分離用デバイス1と適宜組合せて、後述する生体成分の分離を行うこともできる。

【0030】

本発明はまた、上述した生体成分分離用デバイス1を使用して、生体成分を含有する液体試料から生体成分を分離（抽出・精製）する方法を提供する。本発明の生体成分の分離方法は、以下の（a）～（d）の工程を少なくとも有する。

- （a）基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように生体成分分離用デバイスを保持する工程、
- （b）磁気応答粒子と、生体成分を含有する液体試料とを接触状態に保持する工程、
- （c）磁気応答粒子を液体試料から分離する処理を行う工程、
- （d）生体成分を磁気応答粒子から分離する処理を行う工程。

【0031】

本発明の方法における工程（a）は、重力の影響を有効に活用するために、前記デバイスを基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように保持する工程である。一般に、生体成分を含有する液体試料から生体成分を分離する場合には、該液体試料の容積が大きいほど目的とする生体成分の回収量が高くなる。しかし、前記容積を大きくする目的で薄い基板に面積の大きな区画室を形成すると、該区画内の液体（液体試料、試薬など）が表面張力の影響を強く受けて該区画室から溢れ出すため、生体成分分離用デバイスとしての機能が損なわれるという問題がある。一方、区画室の深さを大きく形成すると表面張力の影響を最小限に抑えながら前記容積を大きくすることが可能であるが、狭い面積に深い溝を形成することは現在の技術およびコストの観点から困難であるため、デバイスが大型化してしまうという問題がある。本発明においては、薄い（1mm～2mm程度の厚みの）チップに面積の大きな区画室を形成したデバイスを、上記工程（a）にて、基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように保持することにより上記問題を解決した。具体的には、例えば、図1に示す区画室2の大きさは、約1mm×約4mm×約15mmの直方形状の空間領域であるが、該区画室2を形成するために基板に形成した溝の大きさは、第一幅方向Xにおける長さ（

第一幅) が約4mm、第二幅方向Yにおける長さ(第二幅) が約15mm、厚み方向Zにおける長さ(深さ) が約1mmであり、安価かつ簡単に前記容積を大きくすることが可能である。

工程(a)において、デバイス1を基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように保持するための手段としては、特に制限されるものではないが、たとえば、上述したチップトレイ13を好適に使用することができる(図3(a), (b))。

【0032】

本発明の方法における工程(b)は、液体試料中の生体成分と磁気応答粒子とを吸着せしめるために、磁気応答粒子と生体成分とを接触状態に保持する工程である。反応室における磁気応答粒子と液体試料中の生体成分とを接触せしめるための磁気応答粒子と液体試料との混合の条件としては、生体成分や磁気応答粒子の性能を損なわないならば、特に制限はない。図1に示す生体成分分離用デバイス1においては、複数個の区画室5に、当該区画室5に突出する突起7を備えており、後述の工程(c)による磁場の制御により磁気応答粒子と突起7を衝突させることで、磁気応答粒子と液体試料とを効率的に攪拌することができる。かかる工程(b)に際し、チップ2に形成された注入口8より、液体試料および磁気応答粒子(磁気応答粒子がチップ内に予め収容された状態でデバイス1が形成されている場合には、液体試料のみ)を区画室5内に導入する。

【0033】

本発明の生体成分分離用デバイス1を用いて液体試料中の核酸を抽出しようとする場合は、上述のように磁気応答粒子として強磁性粒子に加えシリカを有するものを使用するのが好適であるが、核酸をシリカに特異的に吸着させ得ることからは、カオトロピック物質を少なくとも含有する核酸抽出精製用溶液を共存させて(カオトロピックイオンの存在下で)、区画室内で磁気応答粒子と液体試料との混合を行うのが好ましい。上記カオトロピック物質としては、ゲアニジン塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、(イソ)チオシアン酸ナトリウム、尿素などから選ばれる少なくとも1種が挙げられ、中でもゲアニジン・チオシアン酸塩が特に好ましい。核酸抽出精製用溶液中のカオトロピック物質の濃度に特に制限

はないが、1モル/L～10モル/Lであるのが好ましい。核酸抽出精製用溶液としては、上記カオトロピック物質以外に、例えば、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、トリス・塩酸緩衝液、Triton-X100などを含有するものを好適に使用することができる。核酸抽出精製用溶液は、上記区画室に供される前に液体試料または磁気応答粒子に予め混合されていてもよいし、区画室内に磁気応答粒子および液体試料を添加した後に、核酸抽出精製用溶液を添加するようにしてもよい。

工程（b）において、区画室に試薬を供給する手段としては、特には制限されるものではないが、たとえば、上述した試薬カートリッジ15を用い、試薬供給口18をチップ2の試薬注入口10に挿入し、区画室内に試薬16を供給することができる（図3（a））。

【0034】

本発明の方法における工程（c）は、磁気応答粒子を液体試料から分離する処理を行う工程である。これにより、磁気応答粒子と上記工程（b）にて磁気応答粒子に吸着せしめた生体成分（以下、これらを「磁気応答粒子一生体成分結合体」ということがある）を、液体試料から単離することで、生体成分を液体試料から単離する。工程（c）は、具体的には、磁気応答粒子に磁場をかけ、磁気応答粒子一生体成分結合体を区画室5より流路6を通じて移動させることにより、行うことができる。工程（c）においては、所望に応じて、磁気応答粒子を感応させて磁気応答粒子一生体成分結合体を区画室5より移動させ得るに十分な磁力を発揮できる永久磁石、電磁石などの従来公知の適宜の磁石を磁場発生源（たとえば、上述したマグネット駆動装置19）として使用することができる。好適には、磁束密度が500ガウス～4000ガウス、特には3000ガウスの磁石が使用される。このように本発明の生体成分分離用デバイスにおいては、磁気応答粒子を生体成分の担体として用い、磁場の制御により生体成分を攪拌、分離、移動させる構成とすることで、装置の大型化の原因となるピペットを用いる工程を減らすことができ、装置の微小化に貢献し得る。

【0035】

本発明の生体成分分離用デバイス1は、上述のように、溝4は、好適には区画

室5およびこれに連通する流路6を有するが、工程(c)による磁場の制御により、上記磁気応答粒子-生体成分結合体を区画室5から流路6に移動させることで、生体成分の液体試料からの分離を実現できる。図1に示した例の生体成分分離用デバイス1において、複数個の区画室5のうちいずれかの区画室を上記工程(b)を行うための区画室として使用することができ（以下、このために使用される区画室を「反応室」ということがある。）、この反応室とこれに隣接する区画室とを連通する流路のうちのいずれかの流路6を、上記工程(c)を行うための流路として使用することができる（以下、このために使用される流路を「分離用流路」と呼ぶことがある。）。

【0036】

本発明の方法における工程(d)は、上記液体試料から分離した後の磁気応答粒子-生体成分結合体から生体成分を遊離させ、これらを分離する工程である。その方法としては、磁気応答粒子-生体成分結合体を適宜の溶媒中に置くことによって生体成分を溶出させる方法の他、磁気応答粒子-生体成分結合体に電場をかけることによって磁気応答粒子から生体成分を分離する方法が用いられ得る。電場をかける条件は、生体成分や磁気応答粒子の性状を損なわない緩やかな条件であることが好ましく、10V～200Vの電圧の印加が好適である。電場は、従来公知のパワーサプライや電気泳動装置などを使用してかけることができる。電場を用いる場合の工程(d)による処理は、上記分離用流路を含む流路のうちのいずれか（例えば、図1に示す例では、流路6のいずれか）で行えばよい。

【0037】

本発明の生体成分分離用デバイス1を用いて核酸を抽出しようとする場合は、例えば、流路に電解質溶液を予め注入しておき、ここに磁気応答粒子-核酸結合体を存在させ、10V～200V程度の電圧を印加する。これにより、核酸のみを正極に移動させることで磁気応答粒子と核酸とを分離し、精製された核酸を得ることができる。また、流路に電解質溶液に浸漬した状態のゲルマトリックスを予め設置しておき、ここに磁気応答粒子-核酸結合体を存在させ、ゲルマトリックスに10V～200V程度の電圧を印加する。これにより、磁気応答粒子はゲルマトリックス内を移動しないため、核酸のみを正極方向に移動させることができ

き、磁気応答粒子と核酸とを分離して、精製された核酸を得ることができる。

このように電場を利用することで、単に水やバッファーに溶出させるだけの場合とは異なり、高収率で磁気応答粒子から生体成分を遊離させることができ、微小量分析の実現に貢献し得る。

【0038】

上記電解質溶液としては、従来公知の組成のものを特に制限なく使用することができる。例えば、TAE（トリス／酢酸／EDTA）、TBE（トリス／ホウ酸／EDTA）というような組成のものが例示される。また、ゲルマトリックスについても、従来公知のものを特に制限なく使用することができる。例えば、ポリアクリルアミドやアガロースなどが例示される。

【0039】

また、工程（d）による電場を用いた生体成分と磁気応答粒子との分離には、適當な孔を有するメンブレンを利用することができる。すなわち、流路において磁気応答粒子一生体成分結合体を含む液をメンブレンで覆い、適當な電圧（10～200V）を印加することにより、磁気応答粒子から生体成分が遊離するので、精製された生体成分を回収することができる。メンブレンは、当分野において従来より広く使用されている適宜のものを特に制限なく使用することができ、例えば、セルロース、セラミック、ポリスルホン、セルロースアセテートなどの素材により形成されたものが使用される。またメンブレンは、上記磁気応答粒子より小さな孔径のものを好適に使用することができる。

また、上記磁気応答粒子一生体成分結合体を含む液としては、例えば磁気応答粒子一生体成分結合体をTAE（トリス／酢酸／EDTA）、TBE（トリス／ホウ酸／EDTA）というような組成の分散媒に分散させたものを好適に使用することができる。

【0040】

磁気応答粒子一生体成分結合体、工程（c）による磁場の制御により上述したような工程（d）による処理を行うための流路に移動させてもよく、また、上記工程（c）より液体試料より分離した後の磁気応答粒子一生体成分結合体をピペットイング手段などによって分取し、工程（d）による処理を行うための流路に

分注するなどしてもよい。上記工程（c）により液体試料より分離した後の磁気応答粒子－生体成分結合体をピペッティング手段などによって他の空間領域（例えば、図1の例においては、区画室2のうち反応室として使用したものを除くいずれか）に移し、磁気応答粒子から生体成分が遊離しない組成および濃度の溶液で前記磁気応答粒子－生体成分結合体を数回洗浄し、上記工程（d）による処理に供するようにしてもよい。これにより、精製された生体成分の純度向上や磁気応答粒子からの生体成分の遊離に対し好ましい結果が得られることがある。

【0041】

本発明の生体成分分離用デバイス1は、上記工程（d）により磁気応答粒子から分離した後の生体成分を収容しておくための空間領域（以下、この空間領域を「回収室」という）を1個以上有していてもよい。このような回収室を有することで、上記工程（d）による処理後の生体成分を、その後の適宜の手段による処理（例えば、核酸またはタンパク質の分析など）に供するまで収納しておくことができる。回収室の大きさには特に制限はなく、複数個有する場合にはすべて同一の大きさであっても互いに異なる大きさであってもよいが、上述した反応室と同程度の大きさであればよい。回収室は、上述した反応室と流路（分離用流路であってもよい）を介して連通されていてもよいし、連通されていなくてもよい。図1に示す例の生体成分分離用デバイス1では、上記複数個の区画室5のうちの反応室として使用するものを除く少なくともいずれかを、回収室として使用することができる。

【0042】

本発明の生体成分分離用デバイス1は、必要に応じ、同時に2つ以上の液体試料を処理したり、同一の液体試料を2つ以上に分けて処理するなど、複数の工程を同時に進め得るように実現されてもよい（例えば、複数個の区画室およびこれらを連通する流路が、第一幅方向Xまたは第二幅方向Yに関して多段に形成された構成など）。この場合、各サンプル用として使用する区画室5、流路6を他のサンプル用として使用するものと区別するために、流路に仕切りを設けてもよい。また、液体試料を移動させる際、すべての移動において磁場・電場を用いる必要はなく、一部においてはピペッティングなどの公知の手段を用いても差し支え

ない（例えば、上述した回収室が反応室と流路を介して連通されている場合には、電場を用いて生体成分を回収室へと移動させることができ、回収室と反応室とが連通されていない場合には、ピペッティング手段にて、工程（d）により磁気応答粒子より分離された後の生体成分を分取し、回収室に分注することができる）。

【0043】

以上の工程（a）～（d）を備える本発明の生体成分の分離方法によれば、液体試料中の生体成分を簡便な操作で、効率よく分離（抽出・精製）することができ、今までの技術では困難であった生体成分を分離するための微小化されたシステムの構築が可能となる。

【0044】

また、本発明においては、生体成分が核酸である場合、上記（a）～（d）の工程の後、分離した核酸を区画室内で増幅する処理をさらに行ってもよい。かかる増幅処理を行う場合、たとえばPCRなど従来公知の核酸を増幅し得る方法を実現すべく、溝4がPCRを行うための区画室（以下、これを「増幅室」という）を有し、当該増幅室内をPCRを行うに好適な温度サイクルに変化させ得る温度管理手段（図示せず）をデバイスと組合わせることで、実現することができる。増幅室の大きさには特に制限はなく、上述した反応室、回収室と同程度の大きさであればよい。複数個有する場合には全て同一の大きさであっても互いに異なる大きさであってもよい。また温度管理手段としては、増幅室内をPCR法を行うに好適な温度サイクルに変化させ得るものであればよく、従来公知のPCR装置に使用される温度管理手段を特に制限なく使用することができる。中でも、ペルチエ素子を利用した温度管理手段を用いると、反応を飛躍的に向上させることができ、好ましい。

【0045】

液体試料より分離した後の核酸の増幅室への移動は、電場を利用できるのは勿論、必要に応じ、ピペッティング等他の公知の方法を利用して差し支えない。PCRに要するポリメラーゼ、基質、プライマー、バッファなどは、試薬として予め増幅室内に注入しておいたり、ピペッティング手段により増幅室に分注してお

けばよい。

なお、液体試料より分離した後の核酸を、移動させることなくそのまま回収室として使用した区画室内で、增幅を行わしめるようにしてもよい。

【0046】

また、本発明の生体成分分離用デバイスは、各工程の少なくとも一つを自動的に制御し得る（好ましくは、すべての工程を自動的に制御し得る）制御手段と合わせて使用されてもよい。かかる制御手段と合わせて使用することにより、生体成分の分離（抽出・精製）の工程の一部または全部を自動化することも可能になる。制御手段は、制御対象とする工程に用いられる駆動源の入切、動作の程度、動作の状態などを制御する制御装置を有している。前記制御装置は、例えば、制御プログラムを有する制御コンピューターを含んだ制御回路、シーケンス制御回路など、上記各工程の動作の制御に必要な制御機器を組み合わせて構成してもよい。また、上記各工程の駆動源に直接駆動信号を送るために必要なドライバー、上記各工程の駆動源の動作状態を検出するために必要なセンサー、スイッチなどは適宜加えてよい。

【0047】

なお、上述してきた説明では、主にDNAの分離（抽出・精製）を主眼に置いてきたが、本発明の生体成分の分離方法はRNAまたはタンパク質についても同様に適用することができる。

【0048】

【発明の効果】

本発明により、従来の技術では困難であった、簡便に効率よく核酸やタンパク質などの生体成分を分離（抽出・精製）することが可能になる。これにより、前記生体成分の分離に関する一連の操作を微小化スケールで実現することが可能となり、診断分野において用いることが可能となる。さらには、本方法の優位性を活かして生体成分の分離（抽出・精製）から分析までの微小化可能なトータルシステム、いわゆる微小化TAS（トータル・アナリシス・システム）を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の生体成分分離用デバイス1の好ましい一例を模式的に示す図である。

【図2】

本発明の生体成分分離用デバイス1を用いた生体成分の分離方法に好適に利用可能な、チップトレイ13、試薬カートリッジ15、マグネット駆動装置19を模式的に示す図である。

【図3】

本発明の生体成分分離用デバイス1を用いた生体成分の分離方法を模式的に示す図である。

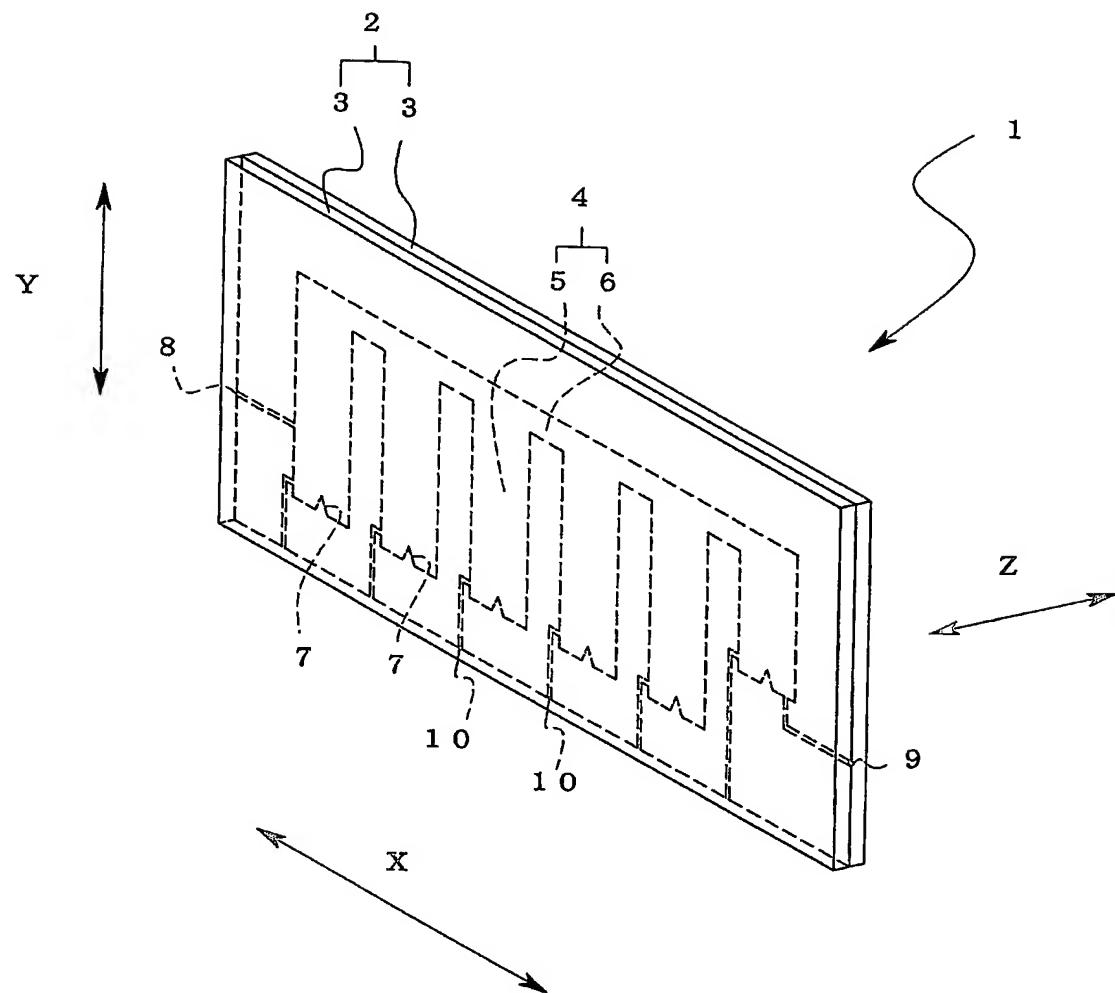
【符号の説明】

- 1 生体成分分離用デバイス
- 2 チップ
- 3 基板
- 4 溝
- 5 区画室
- 6 流路

【書類名】

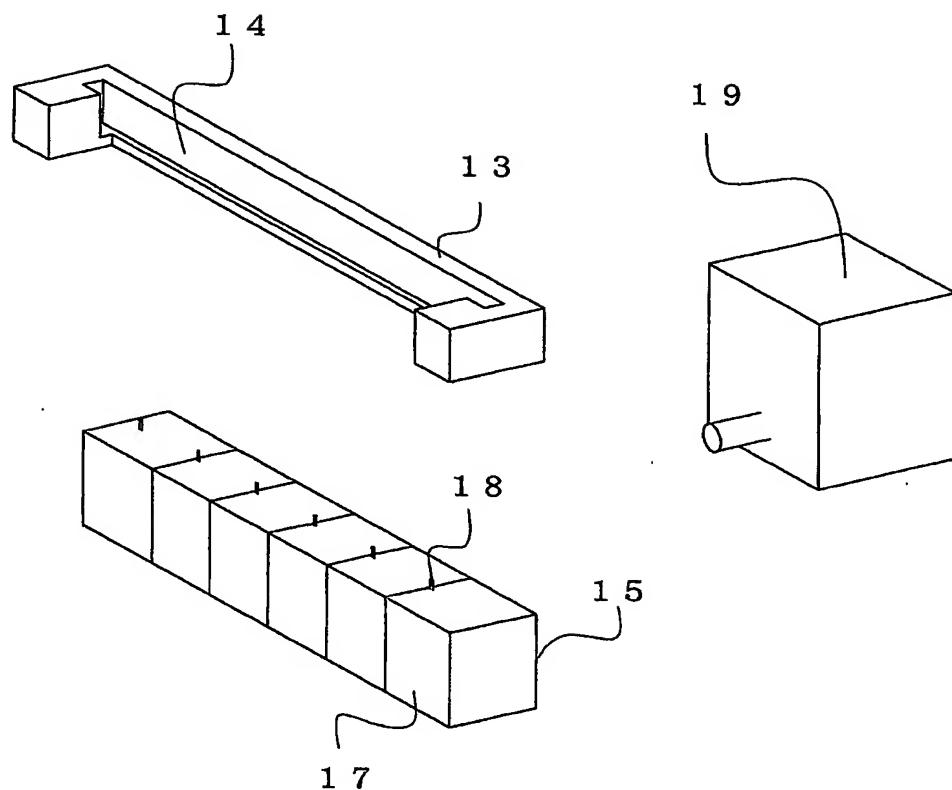
図面

【図1】



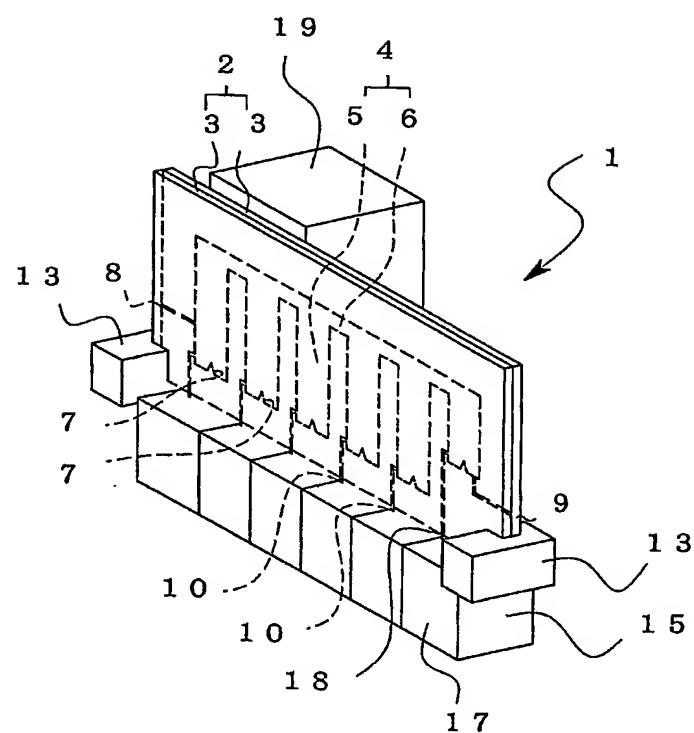
1	生体成分分離用デバイス
2	チップ
3	基板
4	溝
5	区画室
6	流路

【図2】

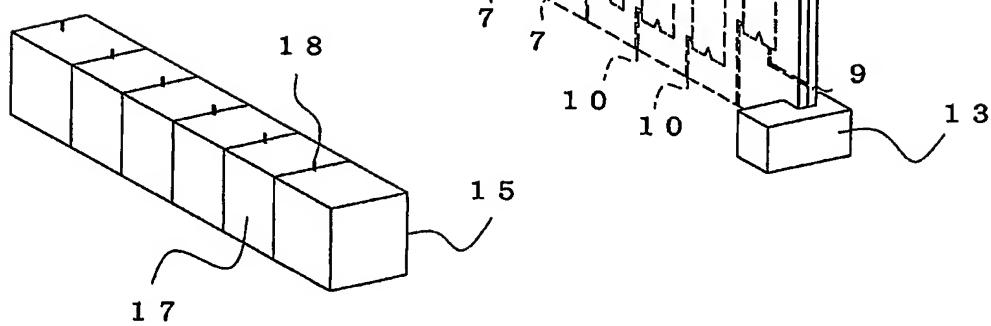
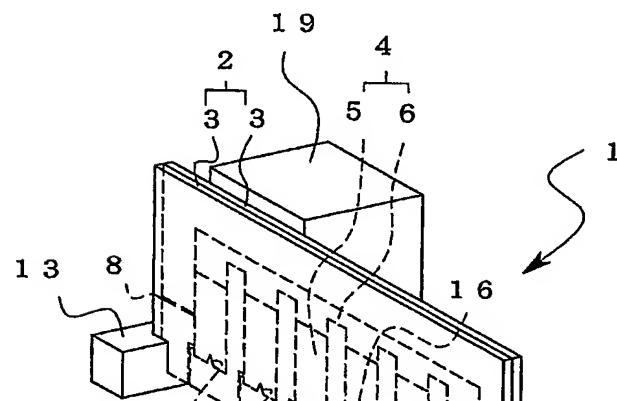


【図3】

(a)



(b)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸やタンパク質などの生体成分を含有する液体試料からの生体成分の分離（抽出・精製）に関する一連の操作を微小化スケールで実現可能なデバイスおよびそれを利用した方法を提供する。

【解決手段】 少なくともいずれかの表面に1または複数本の溝が形成されてなる一対の基板を上記溝が内側となるように貼り合わせてなるチップと、磁気応答粒子とを備える生体成分分離用デバイス、ならびに、当該デバイスを用いて（a）基板の貼り合わせ面が水平方向に対し略垂直となるように生体成分分離用デバイスを保持する工程、（b）磁気応答粒子と、生体成分を含有する液体試料とを接触状態に保持する工程、（c）磁気応答粒子を液体試料から分離する処理を行う工程、（d）生体成分を磁気応答粒子から分離する処理を行う工程を経て、液状試料より生体成分を分離する方法。

【選択図】 図 1



特願 2003-197937

出願人履歴情報

識別番号

[000003160]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住所
氏名大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
東洋紡績株式会社

出願人履歴情報

識別番号

[000005810]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所
氏名

2002年 6月10日

住所変更

大阪府茨木市丑寅1丁目1番88号
日立マクセル株式会社